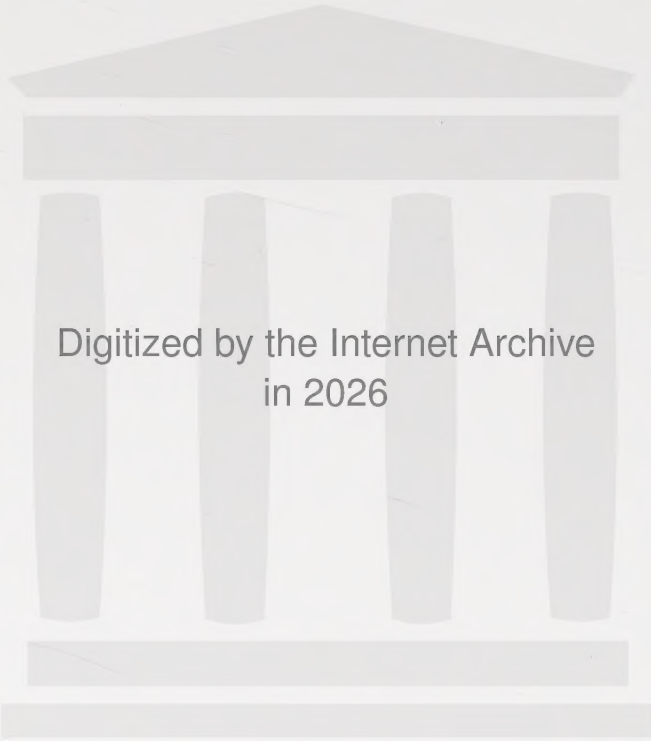


**Über die Einwirkung
verschiedener Organextrakte
von Säugetieren auf
experimentelle Tumoren der Maus**

1975

André Stark



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. Med. Klinik der Universität München
Lehrstuhl für Innere Medizin spez. Haematologie
(Komm. Leiter: Prof. Dr. med. R. Marx)

ÜBER DIE EINWIRKUNG VERSCHIEDENER ORGANEXTRAKTE
VON SÄUGETIEREN AUF EXPERIMENTELLE TUMOREN DER MAUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

André Stark

aus

Stockholm

1974



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. R. MARX
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. <i>W.</i> BRENDEL
Dekan:	Prof. Dr. <i>W.</i> SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juli 1975

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	Seite 1
II. Material und Methodik	Seite 2
1. Herstellung von Extrakten	Seite 2
2. Tierversuche	Seite 7
III. Ergebnisse	Seite 13
1. Wirkung der Extrakte auf die Überlebensdauer nach Tumortransplantation	Seite 13
2. Wirkung der Extrakte auf Milzgewicht, Leberge- wicht und Körpergewicht bei C57BL/6J-Mäusen mit lymphatischer Leukämie	Seite 15
IV. Diskussion	Seite 23
V. Zusammenfassung	Seite 27
VI. Schrifttumverzeichnis	Seite 28

I. EINLEITUNG

Eine wesentliche Eigenschaft von normalem Gewebe ist das Bestehen eines Gleichgewichtes zwischen Zellproduktion und Zellverlust. Zur Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichtes ist eine ständige Kontrolle der Zellteilungsrate notwendig. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei gewebsspezifische Proliferationsinhibitoren, die als Chalone bezeichnet werden (8, 10, 11, 15, 16, 22, 23, 25, 27). Innerhalb der letzten Jahre konnten relativ reine Präparationen dieser Chalone aus Gewebsextrakten dargestellt werden. Chemisch gesehen handelt es sich um relativ niedermolekulare Proteide (14). Bei epidermalen Carcinomen und granulocytärer Leukämie konnte mit den entsprechenden Chalonen (10, 11), d.h. epidermalem Chalon bzw. granulocytärem Chalon eine gute therapeutische Wirkung mit teilweise völliger Tumorrückbildung erzielt werden (31). Es war das Ziel unserer Arbeiten die tumorhemmende Wirkung niedermolekularer, wässriger Organextrakte bei transplantierbaren Mäusetumoren, vor allem bei akuter lymphatischer Leukämie zu untersuchen. Der Schwerpunkt lag vor allem auf der Herstellung niedermolekularer Extrakte mit einem Molekulargewicht der Wirksubstanzen teilweise unter 5000. Das Molekulargewicht der Extraktwirksubstanzen lag damit teilweise unter dem der bisher bekannten Chalone. Die zellproliferationshemmende Wirkung von Extrakten im niedermolekularen Bereich wurde deshalb bevorzugt untersucht, weil Stoffe in diesem Molekulargewichtsbereich, soweit es sich um Polypeptide handelt (24), keine, bzw. eine schwache antigene Wirkung zeigen und nach Aufklärung der Struktur eine Synthese möglich erscheint (1, 2, 3, 5, 7, 12, 29). Durch Verwendung von Extrakten verschiedener Organe bei einer Tumorerkrankung des lymphatischen Systems wurde untersucht, ob eine Organspezifität der Extraktwirkung wie bei den Chalonen besteht.

II. MATERIAL UND METHODIK

1. Herstellung von Extrakten

- a) Extrakt im Molekulargewichtsbereich von
ca. 700 - 15000

Für die Herstellung der Extrakte wurden Organe bzw. Serum und Erythrozyten von frischgeschlachteten Kälbern verwendet. Es wurden folgende Organe zu Extrakten verarbeitet: Milz, Leber, Niere, Herzmuskel und periphere Muskulatur. Die Organe wurden teilweise innerhalb von 1 - 3 Stunden nach Schlachtung der Kälber oder nach 1 - 3tägiger Aufbewahrung in einer Gefriertruhe (- 25° C) verarbeitet.

1 kg Organgewebe wurde nach Entfernung von Fascien und Kapsel in kleine Stücke geschnitten und mit aqua bidest ad 4 l Gesamtvolumen versetzt. Nach Homogenisation mit einem Ultra Turrax Homogenisator (3 - 5 min; ca. 9000 - 10000 U/min) wurde das Homogenat in einen Visking Dialyseschlauch⁺ (3 1/4 SS; Wandstärke ca. 0,09 mm; Ausschluß-Grenze MG. 10000 - 20000) eingefüllt und 48 Stunden gegen 20 l aqua bidest bei 4° C dialysiert. Bei der Darstellung von Serum- und Erythrozytenextrakt wurden 4 l Serum bzw. 4 l gewaschene Erythrozyten (2 Waschungen mit 0,9 % NaCl) dialysiert. Zur Verhinderung bakteriellen Wachstums wurden 100 mg Ampicillin und 100 mg Oxacillin zugegeben. Nach Beendigung der Dialyse wurde das Homogenat verworfen und das Dialysat im Vakuum-Rotationsverdampfer bis auf ein Restvolumen von ca. 0,4 - 0,8 l eingedampft. (20 l Verdampferkolben; Badtemp. ca. 47° C; Dampftemp. ca. 28 - 32° C; Dampfdruck ca. 15 - 30 mm Hg). Zur

+ = Fa. SERVA, HEIDELBERG

Vakuumerzeugung wurden kombiniert zwei Wasserstrahlpumpen (Kondensatabsaugung) und eine Öl-Rotationspumpe⁺ mit ca. 3,5 m³ Saugvermögen/h verwendet. Das Restvolumen wurde in Stahlbechern bei ca. 5000 U/min 5 min zentrifugiert und der Überstand von dem beim Zentrifugieren gebildeten Niederschlag (ca. 1 ml; weißlich-fettige Konsistenz) dekandiert. Durch Zugabe von aqua bidest wurde das Volumen auf 1 l gebracht und über eine Sephadex G-10 Füllung⁺⁺ (14,2 x 81 cm) einer Säule (14,2 x 100 cm) eingefüllt. Nach vollständigem Eindringen des eingefüllten Volumens in das Gelbett wurde mit 200 ml aqua bidest nachgewaschen und das Säulenvolumen oberhalb des Gelbettes mit aqua bidest aufgefüllt.

Bei der anschließenden Gelchromatographie wurde als Laufmittel aqua bidest verwendet; sammeln des Ausschlußvolumens (2700 - 5200 ml; Volumenmessung nach Waschen des Gelbettes mit 200 ml aqua bidest; Fraktionierbereich 0-800 MG) mit anschließender Lyophilisation (Gamma I Gefriertrockner⁺⁺⁺). Lösung des Rückstandes nach Lyophilisation ad 100 ml mit aqua bidest; Einfüllen in einen Visking-Dialysierschlauch (27/32; Wandstärke 0,025 mm; Ausschlußgrenze MG 10000 - 20000). 20 Stunden Dialyse gegen 1000 ml aqua bidest bei 4° C. Bei der ersten Extraktpräparation (Tab. 1) wurde keine zweite Dialyse durchgeführt, sondern nach der G-10 Gelchromatographie, wie unten beschrieben, ein erneuter G-10 Säulenlauf durchgeführt. Lyophilisation des Dialysats, Aufnahme des Rückstandes in 200 ml aqua bidest, Auftragen auf eine G-10 Füllung (7,5 x 90 cm) einer Säule (7,5 - 100 cm).

+ = Fa. BRAND

++ = Fa. PHARMACIA, UPPSALA/SCHWEDEN

+++ = Fa. CHRIST, OSTERODE

Nach Eindringen des aufgetragenen Volumens in das Gelbett; Gelchromatographie mit aqua bidest als Laufmittel. Sammeln des Ausschlußvolumens (950 - 1550 ml nach Auftragen des Probevolumens); Lyophilisation. Aufnahme des Rückstandes in ein bestimmtes Volumen 0,9 % NaCl-Lösung; 0,1 ml dieses Extraktes entsprachen 5 - 20 g Organgewebe bzw. 10 - 20 ml Serum oder Erythrozyten.

- b) Extrakte im Molekulargewichtsbereich von ca. 700 - 4000

Für die Darstellung von niedermolekularem Milz- und Serumextrakt wurde der entsprechend der Darstellung von Extrakten im mittleren Molekulargewichtsbereich nach dem zweiten G-10 Lauf dargestellte Lyophilisationsrückstand in 30 ml aqua bidest gelöst. Abtrennung und Verwerfen des Ausschlußvolumens an einer G-25 Säule (5 x 90 cm, Laufmittel aqua bidest). Nach Lyophilisation des Resteluats Lösung in 0,9 % NaCl entsprechend 10 g-Äquivalenten Milzgewebe/ 0,1 ml Extrakt, bzw. 20 ml-Äquivalenten Serum/ 0,1 ml Extrakt.

- c) Extraktfraktionen nach G-25 Gelfraktionierung

Bei Lebergewebe und Erythrozyten wurde nach Lösung des Lyophilisationsrückstandes nach dem zweiten G-10 Lauf (entsprechend der Präparation nach Abschnitt a)) in 30 ml aqua bidest gelöst und auf eine Sephadex G-25 Säule (5 x 148 cm, Laufmittel 0,01 n. NH_4HCO_3 ; Durchflußgeschwindigkeit ca. 160 ml/Stunde) aufgetragen. Auftrennung des Säuleneluates mit dem Fraktions-sammler Radi-Rac⁺; Registrierung der Trans-

+ = Fa. LKB, STOCKHOLM/SCHWEDEN

mission mit 10-Zollschreiber des Spektraphotometers DB-G⁺ (Durchflußküvette). In Tabelle 1 sind die den Fraktionen 1 - 5 entsprechenden Eluationsvolumina sowie die angenäherten Molekulargewichtsbereiche angegeben (6).

Tabelle 1

	Eluationsvolumen	Mol-Gew.
Fraktion 1	1050 - 1450 ml	ca. 5000
Fraktion 2	1450 - 1750 ml	ca. 2950
Fraktion 3	1750 - 2200 ml	ca. 2400
Fraktion 4	2200 - 2650 ml	ca. 1950
Fraktion 5	2650 - 3250 ml	ca. 1600

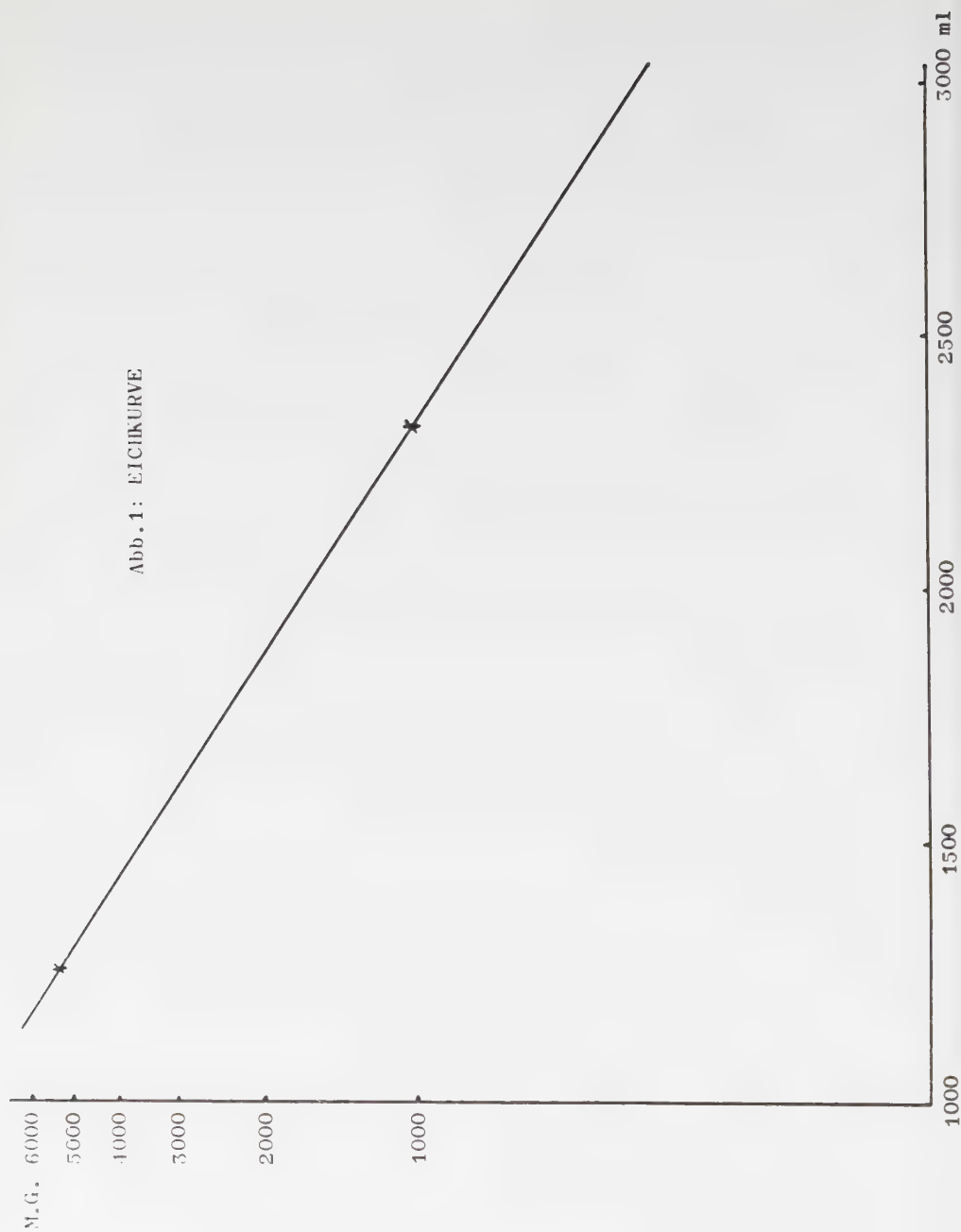
Entsprechend den Schwierigkeiten bei der Beschaffung wasserlöslicher Eichsubstanzen (ACTH MG. 5300, Oxytocin MG. 1007) sowie dem Einfluß von Molekülkonfiguration und chemischer Struktur auf die Eluationsvolumina konnte nur eine angenäherte Zuordnung von Molekulargewicht und Eluationsvolumen erfolgen (Abb. 1) (6). Nach Lyophilisation der Fraktionen F₁ - F₅ Lösung des Rückstandes in 0,9 % NaCl entsprechend 5 g-Äquivalenten Lebergewebe bzw. 5 g-Äquivalenten Erythrozyten/0,1 ml Extrakt.

d) Serumfraktion F (Molekulargewicht ca. 2000)

Nachdem die Bestimmung der Überlebensdauer von C57BL/6J-Mäusen mit lymphatischer Leukämie eine Erhöhung derselben nach Anwendung von Serumextraktfraktionen F₃ und F₄ erbrachte, wurde eine vereinfachte Methodik zur Präparation von Serumsubstanzen in dem

+ = Fa. BECKMAN, MÜNCHEN

Abb. 1: EICHKURVE



entsprechenden Molekulargewichtsbereich ausge-
arbeitet.

Kälberserum wurde entsprechend der Extrakt-
darstellung nach a) dialysiert und mit einer Sepha-
dex G-10-Füllung (14,2 x 81 cm) durch Sammeln
des Ausschlußvolumens entsalzt. Nach Lyophili-
sation wurde der Rückstand in ca. 60 ml aqua
bidest gelöst und auf 80 ml gebracht. Die Lö-
sung wurde mit einer peristaltischen Pumpe
(LKB Typ 4912 A) auf eine Sephadex G-25-Säule
(5 x 90 cm) aufgetragen, die vorher mit 0,01-
normaler NH_4HCO_3 -Lösung äquilibriert worden
war. Bei Verwendung dieser Lösung als Laufmit-
tel Sammeln des Eluatvolumens 1050 - 1590 ml
nach Beginn des Säulenlaufes. Dieses Eluat ent-
spricht angenähert den kombinierten Serumfrak-
tionen F_3 und F_4 (Molekulargewicht ca. 2000),
Lyophilisation und Aufnahme des Rückstandes
in 0,9 % NaCl-Lösung entsprechend 10 ml Serum-
äquivalent/0,1 ml Extrakt. Dieser Extrakt wur-
de als Serumextrakt F bezeichnet.

Tierversuche

Die Auswirkungen der Extrakte auf Überlebens-
dauer von Tieren mit malignen Tumoren wurden
an 4 transplantierbaren Tumormodellen der Maus
untersucht:

- a. Akute lymphatische Leukämie
- b. Myeloische Leukämie
- c. Ehrlich-Ascitestumor
- d. Mamma-Ca

Wir verwendeten für die akute lymphatische, für die myeloische Leukämie und das Mamma-Ca weibliche Mäuse des Stammes C57BL/6J, aus dem JACKSON Lab., CHICAGO USA. Für den Ehrlich-Ascitestumor verwendeten wir weibliche NMRI-Mäuse (Versuchstierfarm VOSS, TUTTLINGEN); der Ascitestumor wurde uns freundlicherweise von Prof. RABES aus dem Pathologischen Institut der Universität München zur Verfügung gestellt.

a) Akute lymphatische Mäuseleukämie

Es wurde eine transplantierbare lymphatische Leukämie verwendet, die 1969 spontan bei einer C57BL/6J-Maus auftrat und durch intraperitoneale Injektion von Milzzellen in fortlaufenden Passagen auf Tiere des gleichen Stammes übertragen wurde. Bei Transplantation von ca. 10^6 Milzzellen/Tier betrug die mittlere Überlebensdauer anfänglich mehrere Wochen, um dann bis zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen auf 7 - 9 Tage abzusinken. Die Leukämie ließ sich nur auf den Stamm, bei dem sie spontan entstanden war, bzw. auf einige Hybride mit guter Histocompartibilität übertragen. Bei unseren Leukämietransplantationen wurde einer leukämischen Maus zum Zeitpunkt der vollen Manifestation des Krankheitsbildes (Bewegungsarmut, Tremor, Kauerstellung; ca. 6 - 7 Tage nach Transplantation) in Äthernarkose die Milz entnommen und in ca. 5 - 10 ml 0,9 % NaCl mit Pinzette und Schere zerkleinert. Durch wiederholte Aspiration und Ausstoßen der angesaugten Flüssigkeit mit einer Tuberkulinspritze wurde eine Zellsuspension dargestellt und nach Sedimentieren von Milzbröckeln (Kapselreste, Gefäße und Bindegewebsstränge) in ein neues Gefäß eingebracht. Zählung der Milz-

zellen/mm³ mit einem elektronischen Partikel-Zähl-Gerät⁺, dessen Schwelle so eingestellt wurde, daß Erythrozyten, Leukozyten und größere Milzzellen bei der Zählung erfaßt wurden. Durch Verdünnen der ursprünglichen Milzzellensuspension mit 0,9 % NaCl wurde eine Suspension mit 5×10^6 Milzzellen/ml dargestellt und sofort in einem Eiswasserbad aufbewahrt. Bei einer randomisierten Gruppe von etwa 40 - 200 C57B1/6J-Mäusen, die mindestens bereits eine Woche nach der Lieferung (Luftfracht USA.) in unserem Tierstall bei Futter und Trinkwasser ad libidum gehalten wurden, intraperitoneale Injektion von 0,2 ml Milzzellensuspension entsprechend 1 Million Zellen. Die maximale Dauer der Suspensionsaufbewahrung im Eiswasserbad betrug etwa 90 min. Nach Beendigung der Transplantation wurden alle Tiere in einen gemeinsamen Behälter gebracht und aus diesem Pool von leukämischen Tieren randomisierte Gruppen gebildet, die in getrennten Käfigen gehalten wurden. Zur Bestimmung der Überlebensdauer nach Applikation von Extrakten, die entsprechend dem Abschnitt Herstellung von Extrakten a) b) und d) (MG: ca. 700 - 15000) dargestellt wurden, erfolgte eine tägliche Injektion von 0,1 ml Extrakt bzw. 0,1 ml 0,9 % NaCl-Lösung bei Kontrollgruppen ab 72 Stunden nach Milzzelltransplantation bis zum Tode der leukämischen Mäuse. Die den verschiedenen Tiergruppen entsprechenden Extrakte, insbesondere die täglich applizierten Organgewichtsäquivalente bzw. Serumvolumensäquivalente sowie Tierzahl/Gruppe können Tab. 2 entnommen werden.

+ = COULTER COUNTER, HÜLS, KREFELD

Bei der Bestimmung der Überlebensdauer von leukämischen Mäusen nach Anwendung von G-25-Fractionen von Erythrozyten und Leberextrakt erfolgte 93 Stunden sowie 101 und 117 Stunden nach Tumortransplantation intraperitoneale Injektion von je 5 g-Äquivalent-Extrakt pro Tier. Bei der Bestimmung der Milz- und Lebergewichte von leukämischen Tieren wurden 96 Stunden nach Tumortransplantation bei 5 Tiergruppen 0,1 ml 0,9 % NaCl bzw. 0,1 ml Extrakt, entsprechend 40 g-Äquivalente niedermolekularen Milzextrakt (700 - 4000 MG) oder 10 g-Äquivalente Leberextrakt oder 40 ml-Äquivalente niedermolekularer Serumextrakt (700 - 4000 MG) intraperitoneal injiziert. Nach weiteren 54 Stunden Tötung der Tiere; Bestimmung der Milz- und Lebergewichte aller Tiergruppen. Bei einer weiteren Versuchsreihe wurden Milzgewichte, Lebergewichte sowie Körpergewicht 54 Stunden nach einer 96 Stunden nach Tumortransplantation durchgeführten Injektion von 10 g-Äquivalenten Milzextrakt, peripherer Muskelextrakt, Herzmuskelextrakt, Lungenextrakt oder 0,9 % NaCl bestimmt.

b) Myeloische Leukämie C 1498 von C57 BL/6J-Mäusen

Bei den Untersuchungen mit myeloischer Mäuseleukämie wurde eine auf C57 BL/6J übertragbare myeloische Leukämie ohne granulocytäre Differenzierung verwendet. Nach Präparation der Milz einer C57 BL/6J-Maus mit myeloischer Leukämie (voll ausgebildetes Krankheitsbild mit Bewegungsarmut, Tremor und Kauerstellung) wurde eine Suspension der Milzzellen hergestellt und 2 Millionen Zellen/Maus in 0,2 ml 0,9 % NaCl i.p. injiziert. 144 Stunden nach Tumortransplantation 4 Tage lang täglich Injektion von 20 g-Äquivalenten

eines speziellen Serumextraktes (Serum-F M.G. ca. 1000 - 2000). Bestimmung der Überlebensdauer nach Tumortransplantation bzw. nach Therapiebeginn.

c) Ehrlich-Ascites-Carcinom von NMRI-Mäusen

Das Ehrlich-Ascites-Carcinom leitet sich von einem im Jahre 1896 spontan entstandenen soliden Maus-Carcinom nach Ehrlich ab. Das Carcinom konnte 1932 durch LÖWENTHAL und JAHN in Ascitesform übergeführt werden. Während des zweiten Weltkriegs konnte durch fortlaufende intraperitoneale Injektion nur der Stamm von Prof. LETTRE in Heidelberg erhalten werden. Der von uns verwendete Unterstamm wurde vom Pathologischen Institut der Universität München zur Verfügung gestellt. Von einer Ehrlich-Ascites-haltigen NMRI-Maus wurden 10 - 20 ml Ascites abpunktiert (ca. 8 - 12 Tage nach Ascitestransplantation). Nach Bestimmung der Zellzahl/mm³ mit dem elektronischen Zählgerät Coulter-Counter wurde mit 0,9 % CaCl-Lösung der Ascites bis auf eine Zellkonzentration von 20 Millionen Zellen/ml verdünnt und bei Aufbewahrung im Eiswasserbad 0,5 ml Ascitesverdünnung entsprechend 10 Millionen Zellen/Maus Gruppen von ca. 20 - 30 NMRI-Mäusen i.p. injiziert. 216 Stunden nach Tumortransplantation Beginn täglicher i.p. Injektion von 0,1 ml Serumextrakt F (M.G. ca. 2000). Bestimmung der Überlebensdauer der mit Extrakt behandelten Gruppen bzw. einer Kontrollgruppe (0,9 % NaCl).

d) Adenocarcinom BW 10232 der Mamma von C57BL/6J-Mäusen

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir ein auf C57BL/6J transplantierbares Mamma-Carcinom der JACKSON-Laboratorien. 14 Tage nach subcutaner Tumortransplantation wurde einer Maus ein etwa erbsengroßes Stück Tumorgewebe entnommen, zerkleinert und eine Zellsuspension in 0,9 % NaCl zubereitet. Durch Verdünnung wurde die Zellkonzentration auf 20 Millionen Zellen/ml gebracht und von der eisgekühlten Zellsuspension 0,1 ml/Maus einer Gruppe von C57BL/6J-Mäusen am rechten Unterbauch subcutan injiziert. Nach 9 Tagen waren die sich entwickelnden Tumoren an der Injektionsstelle bis auf ca. Erbsengröße gewachsen; es wurde 5 Tage lang täglich 0,2 ml Serumextrakt F (20 ml-Äquivalente, M.G. ca. 2000) intraperitoneal injiziert. Bestimmung der Überlebensdauer bei der mit Extrakt behandelten Gruppe und einer Kontrollgruppe (0,9 % NaCl).

2. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Im allgemeinen verwendeten wir für unsere Versuche mehrere Gruppen von je 20 - 40 Mäusen, wobei eine Gruppe mit intraperitonealer Injektion von 0,9 % NaCl als Kontrollgruppe diente und bei den anderen Gruppen jeweils ein bestimmter Extrakt injiziert wurde. Alle bei einem Versuch verwendeten Tiere entstammten der gleichen Tiersendung und wurden durch Randomisierung den verschiedenen Gruppen zugeteilt. Die Wirkung der bei einem Versuch verwendeten verschiedenen Extrakte bei den Tiergruppen wurde durch statistischen Vergleich der bei diesen Gruppen bestimmten Parameter (Überlebens-

dauer, Organgewichte) mit den Parametern bei den Kontrollgruppen ermittelt. Die Prüfung auf Signifikanz von Mittelwertdifferenzen der gemessenen Parameter wurde mit dem verteilungsfreien Kolmogoroff-Smirnoff-Test durchgeführt. Er gilt als schärfster Homogenitätstest und erfaßt Unterschiede der Verteilungsform aller Art (28, 30). Entsprechend der log-normalen Verteilung der Meßwerte bei Überlebensdauerbestimmungen und bei der Bestimmung der Wirkung von Substanzen auf lebendes Gewebe wurde bei fehlender Signifikanz beim Kolmogoroff-Smirnoff-Test nach logarithmischer Transformation der Student-T-Test durchgeführt.

III. ERGEBNISSE

1. Wirkung der Extrakte auf die Überlebensdauer nach Tumortransplantation

a) Lymphatische Leukämie von C57BL/6J-Mäusen

Die intraperitoneale Injektion von niedermolekularen wässrigen Extrakten im Molekulargewichtsbereich von ca. 700 - 15000 sowie von speziellen niedermolekularen Extraktpräparationen (M.G. ca. 700 - 4000) ergab eine signifikante Erhöhung der Überlebensdauer mit Ausnahme der Erythrozytenextrakte. Die zur Ermittlung einer stressbedingten Beeinflussung der Tumorüberlebensdauer durchgeführte Behandlung mit Methylprednisolon (Urbason^R) bzw. synthetischen ACTH (Synacten^R) ergab keine Erhöhung der Überlebensdauer. Während ACTH keinen Einfluß auf die Überlebensdauer hatte, wurde durch hochdosierte Corticoidmedikation sogar eine signifikante Senkung der Überlebensdauer bewirkt. Einzelheiten der in 6 Versuchsreihen durchgeführten

Überlebensdaueruntersuchungen können Tabelle Nr. 2 entnommen werden.

Entsprechend der Wirkungslosigkeit von Erythrozytenextrakt auf die Tumorüberlebensdauer zeigten auch die Erythrozytenextraktfraktionen F₁ - F₅ keine signifikante Wirkung. Die Fraktionierung von Leberextrakt erbrachte ebenfalls keine signifikante Erhöhung der Überlebensdauer (Tabelle Nr. 5).

b) Ehrlich-Ascites-Carcinom

Bei zwei Versuchsreihen mit NMRI-Mäusen, denen intraperitoneal Ehrlich-Ascites-Tumor injiziert worden war, ergab sich bei wiederholter Injektion von Serumextrakt F keine signifikante Beeinflussung der Überlebensdauer (Tabelle 4).

c) Myeloische Leukämie C 1498 von C57BL/6J-Mäusen

Bei einer Versuchsreihe mit intraperitonealer Injektion einer Milzzellensuspension von einer Maus mit myeloischer Leukämie C 1498 wurde nach wiederholter intraperitonealer Injektion von Serumextrakt F keine signifikante Beeinflussung der Überlebensdauer erzielt (Tabelle 4).

d) Adenocarcinom Bw 10232 der Mamma von C57BL/6J-Mäusen

Eine Versuchsreihe mit subcutaner Transplantation einer Tumorzellsuspension des Adenocarcinoms Bw10232 erbrachte eine deutliche signifikante Erhöhung der Überlebensdauer (9,3 %) nach wiederholter intraperitonealer Injektion von Serumextrakt F (Tabelle 4).

2. Wirkung der Extrakte auf Milzgewicht, Lebergewicht und Körpergewicht bei C57BL/6J-Mäusen mit lymphatischer Leukämie

a) Milzgewichte zum Todeszeitpunkt

Das bei allen Versuchen zur Ermittlung der Überlebensdauer (Tabelle 2, V 1 - 5) zum Todeszeitpunkt ermittelte Milzgewicht ergab bei fast allen Organextrakten eine signifikante Erhöhung. Urbason und ACTH ergaben eine signifikante Erniedrigung des Milzgewichtes; Endoxan bewirkte in der verwendeten sehr hohen Dosierung eine extreme Erniedrigung des Milzgewichtes um ca. 90 % (Tabelle Nr. 5).

b) Milzgewichte und Lebergewichte/g Körpergewicht bei Tötung nach einmaliger Extraktinjektion

Die bei zwei Versuchsreihen 54 Stunden nach Extraktinjektion ermittelten Leber- und Milzgewichte/g Körpergewicht ergaben im allgemeinen nur geringe Unterschiede zwischen den mit Extrakt behandelten Mäusen und den NaCl-Kontrollen. Bei teilweise signifikanten Gewichtsunterschieden wurde durch einen Teil der Extrakte eine Senkung und durch die anderen Extrakte eine Erhöhung der Milz- und Lebergewichte bewirkt. Eine hochsignifikante Senkung von Leber- und Milzgewichten wurde durch Leberextrakt und eine hochsignifikante Erhöhung durch Herzmuskelextrakt bewirkt (Tabelle Nr. 6).

c) Vergleichende Bestimmung des Körpergewichtes vor und nach Extraktinjektion

Die bei einer Versuchsreihe neben der Bestim-

mung von Leber- und Milzgewicht/g Körpergewicht durchgeführte Bestimmung des Körpergewichtes vor Extraktinjektion und 54 Stunden später bei Tötung der Tiere ergab nur eine geringfügige, nichtsignifikante Senkung des Körpergewichtes nach Injektion von Extrakt bzw. 0,9 % NaCl mit Ausnahme des Leberextraktes (Tabelle Nr. 7).

Tabelle 2 : Überlebensdauer bei lymphatischer Leukämie nach verschiedenen Extrakten.

Extrakt	M.G.	E.D.	n	$\bar{x}$	% 0 h 72 h		$2\sigma\bar{x}$	p
NaCl	-	0,1 ml	40	205	-	-	11,8	-
Milz	700-25000	5 g	42	221	7,8	12,0	14,2	0,02
NaCl	-	0,1 ml	33	203	-	-	-	-
Urbason	-	50	33	186	8,3	12,8	8,4	0,01
ACTH	-	0,1 E	28	198	2,4	3,7	9,6	0,2
NaCl	-	0,1 ml	38	178	-	-	2,8	-
Serum	700-15000	10 ml	39	203	14,1	23,2	9,2	0,001
Milz	700-15000	10 g	38	191	7,8	12,6	4,2	0,001
Ery	700-15000	5 g	39	179	1,0	1,1	3,8	0,2
NaCl	-	0,1 ml	40	193	-	-	6,6	-
Milz	700-4000	10 g	39	207	6,9	11,0	9,4	0,001
Lunge	700-15000	5 g	39	209	8,0	12,8	7,0	0,001
Serum	700-4000	20 ml	38	221	14,2	22,6	8,4	0,001
Niere	700-15000	5 g	39	219	13,4	21,4	7,6	0,001
NaCl	-	0,1 ml	40	230	-	-	27,4	-
Leber	700-15000	5 g	38	255	10,7	15,8	10,4	0,001
Herzmuskel	700-15000	5 g	37	260	13,9	20,3	18,4	0,001
Per. Muskel	700-15000	5 g	37	271	17,9	25,9	32,2	0,02
Endoxan	-	2 mg	35	284	23,5	34,2	24,6	0,001

Extrakt = verwendetes Organgewebe bzw. Hormone oder 0,9 % NaCl.

M.G. = angenäherter Molekulargewichtsbereich.

E.D. = tägliche Einzeldosis.

n = Zahl der Mäuse/Gruppe.

$\bar{x}$ = mittlere Überlebensdauer in Stunden nach Tumortransplantation.

% = prozentuale Erhöhung bzw. Senkung von $\bar{x}$ nach Tumortransplantation (0 h) und nach Beginn der Extraktgabe (72 h) gegenüber NaCl-Kontrollen.

$2\sigma\bar{x}$ = doppelte Standardabweichung von $\bar{x}$.

p = Signifikanz der Differenzen von $\bar{x}$ zwischen Extrakt und NaCl-Kontrollen.

Tabelle 3: Überlebensdauer bei lymphatischer Leukämie nach verschiedenen Extraktfraktionen.

Extrakt	M.G.	E.D.	n	$\bar{x}$	$2\sigma\bar{x}$	p
NaCl	-	0,1 ml	15	243,2	19,8	-
Ery						
F ₁	5000	5 g	14	258,0	20,4	0,2
F ₂	2950	5 g	14	235,7	22,6	0,5
F ₃	2400	5 g	14	260,6	19,2	0,2
F ₄	1950	5 g	15	246,4	18,4	0,5
F ₅	1600	5 g	11	262,9	23,0	0,2
NaCl	-	0,1 ml	15	226,8	20,0	-
Leber						
F ₁	5000	5 g	15	218,0	10,6	0,5
F ₂	2950	5 g	14	225,4	10,8	0,2
F ₃	2400	5 g	15	226,8	18,8	0,5
F ₄	1950	5 g	15	230,0	11,4	0,5
F ₅	1600	5 g	15	231,6	7,4	0,5

Extrakt = verwendete Organgewebsfraktionen bzw. 0,9 % NaCl.

M.G. = angenäherter Molekulargewichtsbereich.

E.D. = tägliche Einzeldosis.

n = Zahl der Mäuse/Gruppe.

$\bar{x}$ = mittlere Überlebensdauer in Stunden nach Tumortransplantation. Erhöhung bzw. Senkung der Überlebensdauer gegenüber NaCl-Kontrollen.

$2\sigma\bar{x}$ = doppelte Standardabweichung von $\bar{x}$.

p = Signifikanz der Differenzen von $\bar{x}$ zwischen Extrakt und NaCl-Kontrollen.

Tabelle 4: Überlebensdauer von Mäusen mit Ehrlich-Ascites-Tumor, myeloischer Leukämie, bzw. Mammacarcinom nach Serum-extrakt F.

Tumor	Extrakt	M.G.	E.D.	n	$\bar{x}$	%	$2\sigma\bar{x}$	p
Ehrlich Ascites Tumor	NaCl	-	0,1 ml	10	435	-	91,4	-
	Serum F	2000	10 ml	18	428	1,6	46,6	0,2
Myeloische Leukämie	NaCl	-	0,2 ml	25	188,9	-	5,6	-
	Serum F	2000	20 ml	35	194,2	2,8	10,6	0,5
Mamma Tumor	NaCl	-		19	499,3		44,6	-
	Serum F	2000		20	547,8	9,3	39,8	0,1

Extrakt = verwendetes Organgewebe bzw. 0,9 % NaCl.

M.G. = angenäherter Molekulargewichtsbereich.

E.D. = tägliche Einzeldosis.

n = Zahl der Mäuse/Gruppe.

$\bar{x}$ = mittlere Überlebensdauer in Stunden nach Tumortransplantation.

% = prozentuale Hebung bzw. Senkung von $\bar{x}$ nach Tumortransplantation.

$2\sigma\bar{x}$ = doppelte Standardabweichung von $\bar{x}$.

p = Signifikanz der Differenzen von $\bar{x}$ zwischen Extrakt und NaCl-Kontrollen.

Tabelle 5: Milzgewichte zum Todeszeitpunkt bei lymphatischer Leukämie.

Extrakt	M.G.	E.D.	n	$\bar{x}$	%	$2\sigma\bar{x}$	p
NaCl	-	0,1 ml	40	336,2	-	28,0	-
Milz	700-25000	5 g	42	303,3	9,8	23,6	0,01
NaCl	-	0,1 ml	33	351,2	-	37,0	-
Urbason	-	50	33	287,3	18,2	21,0	0,05
ACTH	-	0,1 E	28	310,8	11,5	30,6	0,1
NaCl	-	0,1 ml	38	366,3	-	20,2	-
Serum	700-15000	10 ml	39	353,9	3,4	40,4	0,05
Milz	700-15000	10 g	38	387,1	5,7	23,0	0,2
Ery	700-15000	5 g	39	339,8	7,2	28,4	0,05
NaCl	-	0,1 ml	40	431,7	-	22,6	-
Milz	700-4000	10 g	39	457,7	6,0	23,2	0,05
Lunge	700-15000	5 g	39	482,3	11,9	28,6	0,01
Serum	700-4000	20 ml	38	479,3	11,0	27,0	0,001
Niere	700-15000	5 g	39	486,0	12,5	25,8	0,001
NaCl	-	0,1 ml	40	245,9	-	24,4	-
Leber	700-15000	5 g	38	337,9	37,0	27,0	0,001
Herzmuskel	700-15000	5 g	37	300,3	22,1	26,2	0,01
Per. Muskel	700-15000	5 g	37	301,2	22,5	28,0	0,01
Endoxan	-	2 mg	35	24,0	90,1	3,4	0,001

Extrakt = Verwendetes Organgewebe bzw. Hormone oder 0,9 % NaCl.

M.G. = angenäherter Molekulargewichtsbereich.

E.D. = tägliche Einzeldosis.

n = Zahl der Mäuse/Gruppe.

$\bar{x}$ = mittleres Milzgewicht in mg.

% = prozentuale Steigung bzw. Senkung von $\bar{x}$ nach Extraktgabe gegenüber den NaCl-Kontrollen.

$2\sigma\bar{x}$ = doppelte Standardabweichung von $\bar{x}$.

p = Signifikanz der Differenzen von $\bar{x}$ zwischen Extrakt und NaCl-Kontrollen.

Tabelle 6 : Wirkung verschiedener Extrakte auf Leber- und Milzgewicht von C57BL/6J-Mäusen mit lymphatischer Leukämie.

Extrakt	M.G.	E.D.	n	Leber				Milz			
				$\bar{x}$	$2\sigma\bar{x}$	%	p	$\bar{x}$	$2\sigma\bar{x}$	%	p
NaCl	-		20	103,3	5,4	-	-	20,6	1,2	-	-
Milz	700-4000	40 g	20	96,6	5,6	6,5	0,02	19,8	1,6	3,9	0,2
Niere	700-15000	10 g	20	101,2	5,0	2,0	0,5	19,4	1,6	5,8	0,1
Leber	700-15000	10 g	15	88,2	5,4	14,6	0,01	17,1	3,6	17,0	0,01
Serum	700-4000	40 ml	20	102,5	4,6	0,8	0,5	19,1	1,6	7,3	0,05
NaCl	-		19	84,0	5,6	-	-	16,2	1,8	-	-
Milz	700-15000	10 g	19	91,5	3,0	8,9	0,05	18,9	1,0	16,7	0,05
Per. Musk.	700-15000	10 g	20	88,5	7,8	5,4	0,5	17,0	2,4	4,9	0,5
Herzmusk.	700-15000	10 g	20	92,0	7,0	9,5	0,01	18,2	2,2	12,5	0,01
Lungenex.	700-15000	10 g	19	87,3	5,4	3,9	0,2	17,6	1,8	8,6	0,5

Extrakt = verwendetes Organewebe bzw. 0,9 % NaCl.

M.G. = angenäherter Molekulargewichtsbereich.

E.D. = tägliche Einzeldosis.

n = Zahl der Mäuse/Gruppe.

$\bar{x}$ = mittleres Leber- bzw. Milzgewicht in mg/g Körpergewicht beim Tod der Tiere.

% = prozentuale Erhöhung bzw. Senkung von $\bar{x}$ (Leber, Milz) gegenüber NaCl-Kontrollen.

$2\sigma\bar{x}$ = doppelte Standardabweichung von $\bar{x}$.

p = Signifikanz der Differenzen von $\bar{x}$ zwischen Extrakt und NaCl-Kontrollen.

Tabelle 7: Körpergewicht bei lymphatischer Leukämie von C57BL/6J-Mäusen vor und nach Behandlung mit Extrakten bzw. 0,9 % NaCl.

Extrakt	M.G.	E.D.	n	vor Leuk. Therapie		nach Tod		%	p
				$\bar{x}$	$2\sigma\bar{x}$	$\bar{x}$	$2\sigma\bar{x}$		
NaCl	-		20	17,7	0,5	17,4	0,58	1,7	0,2
Milz	700-4000	40 g	20	16,4	0,54	16,2	0,52	1,2	0,2
Niere	700-15000	10 g	20	17,4	0,54	17,1	0,52	1,7	0,2
Leber	700-15000	10 g	15	15,5	0,62	15,5	0,52	0,7	0,2
Serum	700-4000	40 ml	20	16,7	0,44	16,4	0,38	1,8	0,2

Extrakt = Verwendetes Organgewebe bzw. 0,9 % NaCl.

M.G. = angenäherter Molekulargewichtsbereich.

E.D. = tägliche Einzeldosis.

n = Zahl der Mäuse/Gruppe.

$\bar{x}$ = mittleres Körpergewicht in g der Mäuse vor der Leukämie-therapie bzw. nach dem Tod derselben.

% = prozentuale Erhöhung bzw. Senkung von $\bar{x}$ zu den beiden oben genannten Zeitpunkten.

$2\sigma\bar{x}$ = doppelte Standardabweichung von $\bar{x}$.

p = Signifikanz der Differenzen von $\bar{x}$ zwischen beiden Zeitpunkten.

IV. DISKUSSION

Die Wirksamkeit der von uns verwendeten niedermolekularen Organextrakten auf die Überlebensdauer von Mäusen mit akuter lymphatischer Leukämie im Sinne einer Erhöhung mit Ausnahme der Erythrozytenextrakte zeigen, daß die für die Erhöhung der Tumorüberlebensdauer verantwortlichen Wirksubstanzen im Säugetierorganismus weit verbreitet sind (4, 5, 8). Dies schließt jedoch nicht aus, daß sie von bestimmten Zellarten bzw. Organen ausschließlich bzw. bevorzugt synthetisiert werden und über den Blutkreislauf abgegeben werden (1, 3, 5, 9, 10, 15, 19, 24, 25). Für eine hämatogene hormonähnliche Abgabe der Wirksubstanzen an die Organe spricht die relativ starke Erhöhung der Tumorüberlebensdauer nach Serumextraktgabe. Während die mehrfache Applikation von Erythrozytenextrakt zu keiner signifikanten Erhöhung der Tumorüberlebensdauer bei lymphatischer Mäuseleukämie führte, konnten durch einmalige Injektion von Erythrozytenextrakt (Untersuchungen unseres Labors) eine starke Erhöhung der Tumorüberlebensdauer erzielt werden, sodaß die Unwirksamkeit mehrfacher Injektionen vielleicht durch Kumulation toxischer Nebenwirkungen bedingt ist (8).

Entsprechend dem niederen Molekulargewicht, dem Fehlen von Antikörpern gegen Serumextrakt drei Tage nach Extraktinjektion beim Ouchterlony-Immundiffusionstest sowie der Tumortransplantation eines spontan aufgetretenen Tumor d.h. der von uns verwendeten Mäuseleukämie im Inzuchtstamm und der in unserem Laboratorium in vitro und in vivo nachgewiesenen Hemmung der DNS-Synthese durch Extrakte (27) erscheinen immunologische Extraktwirkungen als Ursache der Erhöhung der Tumorüberlebensdauer unwahrscheinlich.

Als wasserlösliche dialysierbare Substanz mit einem Molekulargewicht kleiner als 10000 ist der Transpherfaktor in einem Teil der Extrakte enthalten. Dieser aus Gewebe von Tieren, die mit bestimmten Antigenen immunisiert wurden, darstellbare Faktor — wahrscheinlich ein Polynucleotid darstellend — vermittelt nach Applikation an nicht immunisierten Tieren die entsprechende spezifische zelluläre Immunität (17, 20). Die bei unseren Untersuchungen mit Organextraktapplikation bei tierischen Tumoren verwendeten Extrakte entstammten Kälbern ohne Immunisierung mit einem Antigen, dem auch die Tumormäuse ausgesetzt worden wären. Es erscheint somit sehr unwahrscheinlich, daß die bei Mäusen mit transplantierbarer lymphatischer Leukämie durch Organextrakt nach wenigen Stunden hervorgerufene Senkung der peripheren Lymphozytenzahl sowie die Erhöhung der Tumorüberlebensdauer durch den Transpherfaktor bedingt sind.

Entsprechend der Senkung der Überlebensdauer der Mäuseseleukämie nach Corticoidgabe (Methylprednisolon) sowie der Unwirksamkeit von ACTH erscheint es unwahrscheinlich, daß die Erhöhung der Überlebensdauer nach Extraktgabe durch eine Stimulierung der Corticoidsynthese der NNR hervorgerufen wird.

Mit Molekulargewichtsfractionen von Erythrozyten und Leberextrakt konnte keine signifikante Erhöhung der Überlebensdauer der leukämischen Mäuse erzielt werden; als mögliche Ursache hierfür könnten Verluste bei der Aufarbeitung in Frage kommen (1, 4, 5).

Die Bestimmung der Milz und Lebergewichte ergab bei den verschiedenen Extrakten keine übereinstimmende Wirkung im Gegensatz zur starken Reduktion des Milzgewichtes nach Endoxan sowie Methylprednisolon und

ACTH, sodaß sich auch hierdurch eine Abgrenzung der Extraktwirkung gegenüber derjenigen der oben angeführten Substanzen ergibt. Die Extraktwirkung bei der lymphatischen Leukämie beruht also nicht auf einer Involution des lymphatischen Gewebes.

Die fehlende bzw. schwache Wirksamkeit von Serumextrakt F bei Ehrlich Ascites Tumor, sowie myeloischer Leukämie und Mamma-Carcinom der Maus kann durch die biochemischen Eigenschaften dieser Tumoren oder durch eine durch die relativ lange Überlebensdauer begünstigte biochemische Gegenregulation gegen die Extraktwirkung bedingt sein (5).

V. ZUSAMMENFASSUNG

Nach Präparation von wasserlöslichen Extrakten aus Serum, Erythrozyten, Milz, Leber, Niere, Herzmuskel und peripherer Muskel im Molekulargewichtsbereich von ca. 700 - 15000 bzw. ca. 700 - 4000 wurde nach täglicher intraperitonealer Extraktinjektion die Beeinflussung der Überlebensdauer bei transplantierbarer lymphatischer und myeloischer Leukämie sowie Mamma-Carcinom und Ehrlich Ascites Carcinom der Maus untersucht. Bei einem Teil der Versuche wurde ferner die Extraktwirkung auf Körpergewicht sowie Milz und Lebergewicht der Mäuse untersucht.

Alle Extrakte mit Ausnahme des Erythrozytenextraktes bewirken eine signifikante Verlängerung der Überlebensdauer bei transplantierbarer lymphatischer Mäuseleukämie; bei den anderen verwendeten Tumoren zeigte sich nur beim Mamma-Carcinom eine geringfügige Erhöhung der Überlebensdauer. Entsprechend dem niedrigen Molekulargewicht der Wirkstoffe, sowie in Vitro- und in Vivountersuchungen unseres Labors über DNS und RNS-Synthese unter Einwirkung der Extrakte erscheint die Überlebensdauererlängerung durch biochemische Wirkung auf die DNS und RNS-Synthese bedingt (1, 2, 3, 13, 14, 18, 21, 24, 27). Immunologische Wirkungen der Extrakte im Sinne einer Intensivierung der immunologischen Tumorabwehr erscheint sehr unwahrscheinlich.

SCHRIFTTUMVERZEICHNIS

- 1) v. ALBERT H. H.: Biochemische Untersuchungen über knochenmarkwirksame Faktoren in Milzextrakten. Zeitschrift inn. Med. Jahrg. 24 (1969) Heft 16.
- 2) v. ALBERT H. H.: Die Wirkung von eiweissfreien Milzextrakten auf die Tetrahydrofolat-Formylase in menschlichen Leukozyten. Klin. Wschr. 43, 751 (1965).
- 3) v. ALBERT H. H.: Hemmwirkungen eines Extraktes aus einer menschlichen Hyperspleniemilz in der Knochenmarkkultur. Klin. Wschr. 40, 211 (1962).
- 4) v. ALBERT H. H.: Zur Frage einer depressorischen Knochenmarkwirkung hypersplener Milzen. I. Experimentelle Untersuchung mit der Deckglaskulturmethode. Blut 9, 405 (1963).
- 5) v. ALBERT H. H. und ZICKGRAF: Zur Frage einer depressorischen Knochenmarkwirkung hypersplener Milzen. II. Experimentelle Untersuchungen an der Flüssigkeitskultur. Blut 12, 104 (1966).
- 6) ANDREWS P.: Estimation of the Molecular Weights of Proteins by Sephadex-Gel-Filtration. Biochem. Journ. 91, 222 (1964).
- 7) ARAKI F. and SUGIHARA Y.: Carcinostatic Substance Prepared from Bovine Spleen. Hiroshima Journal of Med. Sciences 18, 253 (1969).
- 8) BARDOS I., GORDON H. L., CHMIELEWICZ Z. F., KUTZ R. L., NADHARNI M. V.: A Systematic Investigation of the Presence of Growth-Inhibitory Substances in Animal Tissues. Cancer Research 28, 1620 - 1630 (Aug. 1968).
- 9) BOCK H. E., FRENZEL B.: Splenogene Knochenmarkhemmung. Klin. Wschr. 17, 1315 (1938).

- 10) BULLOUGH W. S., HEVETT C. L., LAURENCE E. B.: The Epidermal Chalone: A Preliminary Attempt at Isolation. Experimental Cell Research 36, 192 - 200 (1964).
- 11) BULLOUGH W. S., LAURENCE E. B.: Mitotic Control by Internal Secretion: The Role of the Chalone-Adrenalin-Complex. Exp. Cell Research 33, 176 - 194 (1964).
- 12) CROSBY W. H. and RUIZ F.: Evidence of a Myeloinhibitory Factor in the Spleen. Blood 20, 793 (1962).
- 13) ESPOSITO S.: Effect on Leukaemic Cells of Ribonucleic Acid Extracted from Calf's Spleen. Nature (London) 203, 1078 (1964).
- 14) FORD L. C., DONALDSON D. M., ALLEN L.: Protection of Mice by Postirradiation Treatment with a Cell-Free Component of Spleen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127, 286 (1968).
- 15) FRESEN O. und KRETSCHMER: Beziehungen zwischen Milz und Hämo-poese. Z. Ges. Exp. Med. 154, 36 (1971).
- 16) GRESSER J., BANDU M., TOREY M., BODO G., PAUCKER K., STEWART W.: Interferon and Cell Division. VII Inhibitory Effect of Highly Purified Interferon Preparations on the Multiplication of Leukaemia L 1210 Cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142, 1, 7 (Jan. 73).
- 17) GROB P. J., BLÄKER F., SCHULZ K. H.: Immunfunktion und Transferfaktor. Dtsch. Med. Wschr. 98 (1973) 446 - 451.
- 18) HAVEMANN K.: Nucleinsäure und Proteinsynthese in Lymphozytenkulturen von Gesunden und Patienten mit chron. lymph. Leukämie u. Lymphogranulomatose. Verh. dtsch. Ges. Inn. Med. 74, 1261 (1968).

- 19) HEILMEYER L.: Physiologische Beziehungen zwischen Milz und Knochenmark. Klin. Wschr. 29, 689 (1955).
- 20) LAWRENCE H.-S.: Transfer Factor. Advanc. Immunol. 11, 195 (1969).
- 21) LOZZIO C. B. and LOZZIO B. B.: Cytotoxic Effect of a Splenic Factor on Human Myeloid Leucaemic Cellines. XIV Int. Congr. of Hematol., Sao Paolo 1972.
- 22) MOHR U., ALTHOFF I. et al.: Melanoma Regression Induced by Chalone: A New Tumor Inhibiting Principle Acting in Vivo. Nature Vol. 220, Okt. 12, 1968.
- 23) PANKOVITS W.: Chalone: Endogene Inhibitoren der Zellteilung. Blut Band XXVII Heft 4, Okt. 1973.
- 24) PANKOVITS W.: Granulopoesis-Inhibiting Factor. Demonstration and Preliminary Chemical and Biological Characterization of a Spezific Polypeptid (Chalone). National Cancer Institute Monograph No. 58.
- 25) RYTÖMAA and KIVINIEMI : Control of Granulocyte Production. I. Chalone and Antichalone, Two Specific Humoral Regulators. Cell Tissue Kinet. 1, 329 - 340 (1968).
- 26) RYTÖMAA and KIVINIEMI : Control of Granulocyte Production. II. Mode of Action of Chalone and Antichalone. Cell Tissue Kinet. 1, 341 - 350 (1968).
- 27) RYTÖMAA and KIVINIEMI : Control of Cell Production in Rat Chloroleukaemia by Means of the Granulocytic Chalone. Nature Vol. 220, 136, Oct. 12, 1968.
- 28) SACHS L.: Statistische Auswertungsmethoden. Springer, Heidelberg 1972.

Herrn Professor Dr. W. Stich sei recht herzlich für die Überlassung des Themas und die Arbeitsmöglichkeiten an seinem Institut gedankt.

Herrn Dr. M. Schmidt danke ich für die wissenschaftliche Betreuung , für das große Verständnis und für die ständige Hilfe während der Anfertigung dieser Arbeit.

Fräulein Papkalla danke ich für die technische Assistenz.

- 29) SCHMIDT M. and STICH W.: The Effect of a Water-Soluble Fraction (mol W. 700 - 500) of Calf Serum on Peripheral Blood-Status of Healthy Adults. XIV Congr. of Hematol. Sao Paolo 1972.
- 30) OHNE NAMEN: Wissenschaftliche Tabellen. Documenta Geigy Basel 1969.
- 31) WOLF H. J., GERLICH N.: Behandlung von Leukämien mit Milzextrakten. Verh. dtsh. Ges. Inn. Med. 61, 266 (1955).

LEBENS LAUF

- 1950 22.4. geboren in Stockholm als Sohn des Kaufmannes Franz Stark und seiner Ehefrau Eva, geborene Kienzl.
- 1957 Eintritt in die Grundschule in Stockholm.
- 1966 Besuch des naturwissenschaftlichen Zweiges des Gymnasiums Norra Real in Stockholm.
- 1969 Abitur.
- 1969 Beginn des Medizinischen Studiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- 1970 Naturwissenschaftliche Vorprüfung.
- 1972 Ärztliche Vorprüfung.
- 1972 Beginn der Doktorarbeit bei Professor Dr. Stich.
- 1975 Staatsexamen

